

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-030776

(43)Date of publication of application : 08.02.1994

(51)Int.Cl.

C12N 15/10

C12M 1/00

C12M 1/08

(21)Application number : 04-185118

(71)Applicant : RIKAGAKU KENKYUSHO

(22)Date of filing : 13.07.1992

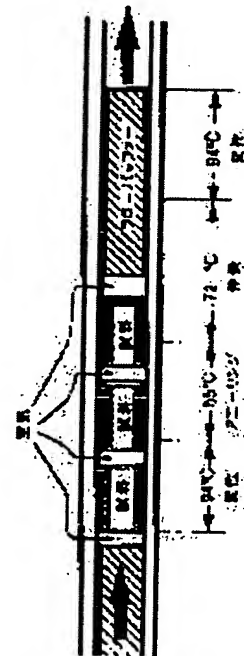
(72)Inventor : NAKANO HIDEO
YAMANE TSUNEO
NAGAMUNE TERUYUKI
YODA MASABUMI
ENDO ISAO

(54) METHOD FOR AMPLIFYING DNA AND DEVICE FOR AMPLIFYING DNA

(57)Abstract:

PURPOSE: To carry out PCR reaction in an accurate heating time by transporting a reaction solution comprising DNA polymerase, template DNA, primer DNA and dNTP as a mobile phase through a reaction tube heated from the outside.

CONSTITUTION: A reaction solution comprising DNA polymerase, template DNA, primer DNA and dNTP is used as a mobile phase and passed through a reaction tube, for example, controlled at 94° C, 55° C and 73° C. The three heating parts of the hydrocarbon tube are set at the outside and the temperature of the reaction solution moving in the reaction tube is regulated.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-30776

(43)公開日 平成6年(1994)2月8日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/10	Z N A			
C 1 2 M 1/00	A			
1/08	A			
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数6(全 7 頁)

(21)出願番号 特願平4-185118

(22)出願日 平成4年(1992)7月13日

(71)出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(72)発明者 中野 秀雄

愛知県岩倉市東新町下境52

(72)発明者 山根 恒夫

愛知県名古屋市中千種区若水3丁目22-1

(72)発明者 長棟 輝行

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(74)代理人 弁理士 中村 稔 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 DNA増幅方法及びDNA増幅装置

(57)【要約】

【構成】DNAポリメラーゼ、鋳型DNA、プライマーDNA、及びdNTPを含む反応液を移動相として、例えば94℃、55℃、及び73℃に調節された加熱部が外部に設けられた反応管内を移動させる工程を含むPCR反応方法を用いたDNA増幅方法及び該方法に使用するDNA増幅装置。

【効果】極めて正確な加熱時間でPCR法行うことができ、加熱時間の遅れによる酵素の失活もなく、増幅効率が低下することがない。蒸発防止用のオイルを使用する必要もなく、多数の試料を用いて同時に増幅反応を行なうことができるので有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 DNAポリメラーゼ、鋳型DNA、プライマーDNA、及びdNTPを含む反応液を移動相として外部に加熱部が設けられた反応管内を移動させる工程を含むPCR反応を用いたDNA増幅方法。

【請求項2】 該加熱部が異なる温度に調節された複数の加熱部を含む請求項1記載の方法。

【請求項3】 約94℃、約55℃、及び約73℃に調節された3種の加熱部を含む請求項2記載の方法。

【請求項4】 該反応液を一定速度で反応管内を移動させる請求項3記載の方法。

【請求項5】 DNAポリメラーゼ、鋳型DNA、プライマーDNA、及びdNTPを含む反応液を内部で移動させるための反応管、該反応管の外側に設けられた加熱部、該反応液を移動させるための動力部を備えたDNA増幅装置。

【請求項6】 さらに、バッファータンク、反応液導入部、及び反応液回収部が設けられた請求項5記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、微量の遺伝子DNAを効率よく増幅するポリメラーゼ連鎖反応法を用いたDNA増幅方法に関する。さらに詳しくはDNAポリメラーゼ、鋳型DNA、プライマーDNA、及びdNTPを含む反応液を移動相として反応管内を移動させるDNA増幅方法及び該方法に使用する装置に関する。

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】微量なDNAを効率的に増幅する方法として、ポリメラーゼ連鎖反応法(polymerase chain reaction, PCR法)が知られている(米国特許第4,683,202号明細書)。この方法は、目的のDNAを熱変性し、得られた1本鎖のDNAに2種類のプライマーをアニーリングし、その後、DNAポリメラーゼを作用させて2本鎖DNAを合成し、さらにこの2本鎖DNAを熱変性して1本鎖DNAを得た後に、プライマーのアニーリング及びDNAポリメラーゼによる相補的DNAの合成というサイクルを繰り返すことにより、指数関数的に目的DNAを増幅させることができる方法である。PCR法は、一般的には約94℃で2本鎖DNAを解離させる工程、プライマーを約55℃でアニーリングする工程、及び耐熱性のDNAポリメラーゼを使用して約72℃で相補鎖の複製を行う工程を含むサイクルを繰り返すことにより行われる。従って、各工程における温度及び反応時間の管理が重要である。

【0002】PCR法を自動的に行う装置として、反応混合物を含むエッペンドルフ型サンプルチューブをアルミ製のブロックに設けられたウェルに挿入し、該アルミブロックの温度をヒーターと冷却器を用いて変化させることにより反応を行う装置が知られている(DNA Thermal Cycler, Perkin-Elmer Cetus Instruments)。この装置

では、ヒートブロックとサンプルチューブの間の熱伝導を促進するために、ウェルとサンプルチューブにより形成される間隙にオイルを充填する等の工夫が施されている。しかし、この手段によっても、ヒートブロックの温度を変化させ始めてからサンプルチューブ内の反応液の温度が目的温度に到達するまでに10ないし30秒程度の遅れがあった。このため、このような時間的遅れによって変性過程(約94℃)の反応時間が延長され、酵素の失活を招き、その結果増幅効率が低下してしまう問題があった。また、反応液の温度を水の沸点近くまで上昇させるため、水分の蒸発やサンプルチューブの蓋の内側での水滴が形成されるので、これを防止するために、サンプルチューブ内の反応液表面に蒸発防止用のオイルを積層しておく必要があった。さらに、多数の試料を用いて増幅反応を行なう場合には、各試料を別々のサンプルチューブに調製して反応させる必要があり、操作が煩雑であった。また、サンプルチューブを固定したバケットを3つの異なる温度に設定された恒温槽に対して次々に機械的に浸漬せしめるPCR装置が知られている(Thermal Sequencer, Iwaki)。しかし、この反応装置は大がかりであるという欠点があった。

【0003】従って本発明は、上記の欠点のないポリメラーゼ連鎖反応法を用いたDNA増幅方法及び該方法に使用する装置を提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、ポリメラーゼ連鎖反応を行うにあたり、DNAポリメラーゼ、鋳型DNA、プライマーDNA、及びdNTPを含む反応液を移動相として用い、外部に加熱部が設けられた反応管内を移動させることにより、該反応液の反応温度及び反応時間を厳密に調節することができ、効率よくポリメラーゼ連鎖反応を行うことができることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、DNAポリメラーゼ、鋳型DNA、プライマーDNA、及びdNTPを含む反応液を移動相として外部に加熱部が設けられた反応管内を移動させる工程を含むPCR反応方法を用いたDNA増幅方法及び該方法に使用する装置を提供するものである。

【0004】本発明の方法に使用される反応液には、DNAポリメラーゼ、鋳型DNA、プライマーDNA、及びdNTPが含まれる。鋳型DNAは増幅の目的となるDNAであり、天然型または非天然型のいずれのDNAであってもよい。鋳型DNAは、当業者に自明の方法により、例えば細胞からSDSプロテアーゼK処理により調製される。また、コロニーから直接抽出したDNAを用いることもできる。通常、鋳型DNAは約0.01~100PM、好ましくは0.1~10PMの濃度で使用すればよい。DNAポリメラーゼとしては、DNA増幅に使用されるDNAポリメラーゼとして当業者に自明なかなるDNA

ポリメラーゼを使用してもよい。本発明の方法に好適に使用されるDNAポリメラーゼとしては、耐熱性のDNAポリメラーゼを挙げることができる。例えば、耐熱酵素のTth(thermus thermophilus)ポリメラーゼ、Taq(thermus aquaticus)ポリメラーゼ等を使用することが好ましい。これらのDNAポリメラーゼは、通常10~40U/ml、好ましくは20U/mlの濃度で使用される。

【0005】プライマーDNAとしては、DNA増幅法に使用できるプライマーDNAとして当業者に自明なものを使用すればよいが、例えば、20-mer程度の合成DNAを使用することができる。プライマーDNAは、例えば、約100~1,000 nM、好ましくは200~500 nMの濃度で使用すればよい。プライマーDNAは、DNA自動合成機を用いることにより必要に応じて当業者が容易に製造できる。上記のDNAポリメラーゼ及びプライマーDNAは、本発明の方法を行うにあたり、増幅効率を最大にすべく選択されることが好ましいが、このような選択は当業者によれば容易になされることである。また、本明細書において、dNTPはdATP、dGTP、dTTP、及びdCTPの任意の割合の混合物であると定義されるが、これら4種のヌクレオチドトリリン酸の等量混合物を使用することが好ましい。例えば、反応液中に4種のヌクレオチドトリリン酸が10~100 μ Mの濃度で含有されることが好ましい。さらに、本発明の方法に使用される反応液は、以上の成分のほかに緩衝剤を含むことが好ましい。PCR法に用いられるDNAポリメラーゼは、一般に反応に使用される緩衝液の種類によって増幅効率が異なるので、使用するDNAポリメラーゼの種類に応じて、好適な緩衝剤を選択することが好ましい。DNAポリメラーゼ、鋳型DNA、プライマーDNA、及びdNTPの配合割合、及び緩衝剤の濃度は、目的に応じて適宜調整すればよいが、このような調整は当業者により容易になされるものである。

【0006】本発明の方法は、上記の反応液中でPCR反応を行うにあたり、この反応液を移動相として用い、外部に加熱が設けられた反応管内を移動させることを特徴とするDNA増幅方法である。本発明の方法に使用する反応管としては、反応管の内部で行われるPCR反応に影響を与えない部材により形成されたものならば、いかなるものを使用してもよい。例えば、テフロン、ポリエチレン、ガラス、ステンレス等により形成された反応管を挙げることができる。反応管の内径は、0.02~1 mm、好ましくは0.05~0.5 mmとすればよい。反応管の内径は、一回に処理される反応液の容量に応じて適宜選択すればよく、微小径の反応管を使用すれば微量のDNA増幅反応を行うことができる。例えば、超微量の反応を行う場合には、ガラスキャピラリーを反応管として使用することができる。反応管の肉厚は、反応管の外側に設置された加熱部から反応管内部の反応液への熱伝導が著しく低下しない限り、いかなるものでもよい。従って、

反応管の外径は使用される部材の種類により異なるが、一般には、0.1~2 mm、好ましくは0.2~1.5 mmとすればよい。テフロン製反応管を使用する場合には、好ましくは内径0.3~0.7 mm、外径1.0~1.8 mm、特に好ましくは内径0.5 mm、外径1.5 mmの反応管を使用すればよい。

【0007】該反応管内で上記の反応液を移動させるには、所定量の反応液を反応管内に導入した後に、空気、窒素ガス、アルゴンガス等の気体流体、蒸留水や緩衝液等の液体流体を反応管内に連続的に導入すればよい。該流体を連続的に導入するにあたり、ペリスタポンプ、高速液体クロマトグラフィー用ポンプ等が好適に使用される。反応液を反応管に導入するには、例えば高速液体クロマトグラフィー用インジェクターを用いて、マイクロシリンジ等により行えばよい。また、反応管内で複数の異なる反応液を連続的に処理する場合には、所定量の反応液を反応管内に導入した後に、空気、窒素ガス、アルゴンガス等の気体流体やオイル等を導入し、さらに所定量の反応液を導入すればよい。この操作を繰り返すことにより、複数の反応液を混じり合わないよう反応管内を搬送させることができ、異なる成分を含む反応液を同時に処理することができる。図1を参照しつつ、反応管内での反応液の搬送状態を説明すると、反応液の導入に先立って、DNAポリメラーゼ、鋳型DNA、プライマーDNA、及びdNTPを含まない緩衝液（フローバッファー）を反応管内に導入し、その後に少量の空気と所定量の反応液を交互に三回繰り返して反応管に導入し、最後にフローバッファーを連続的に反応管内に導入して、反応管内で反応液を移動させる。

【0008】本発明の方法では、上記の様に反応管内で反応液を移動させるに際して、反応管の外側に設けられた加熱部により、反応管内を移動する反応液の温度を調節する。一般にPCR法は、通常約94℃で2本鎖DNAを解離させる工程（変性）、プライマーを約55℃でアニーリングする工程（アニーリング）、及び耐熱性のDNAポリメラーゼを使用して約72℃で相補鎖の複製を行う工程（伸長）を含むサイクルを基本単位として行われる。このため、本発明の方法においては、好ましくは、反応管の外側にそれぞれ上記3種の温度に調節された変性工程用加熱部（94℃）、アニーリング工程用加熱部（55℃）、及び伸長工程用加熱部（72℃）を順次設け、反応管内を移動する反応液が上記3種の異なる温度で所定時間加温されるようにすればよい。反応管の材質によっては熱伝導率が十分でない場合があるので、このような場合には反応管の外側に設けられた加熱部の温度を反応液温度よりも若干高めに設定すればよい。通常、反応液は反応管内を一定速度で移動するように搬送されるので、反応管に設けられた加熱部の長さに応じて加熱時間を調節することができる。また、加熱部の長さを一定にしておいて反応液の移動速度を変化させて加熱時間を調

節してもよい。加熱部の長さ及び反応液の移動速度の両者を変化させて加熱時間を調節してもよい。

【0009】図1を参照しつつ説明すると、本発明の方法は、例えば変性工程を94℃で1分30秒、アニーリング工程を55℃で2分、及び伸長工程を72℃で3分行う場合に、反応管の外側に設けられた94℃、55℃、及び72℃の加熱部の長さを3:4:6に調節して、一定速度で反応液を搬送することにより行うことができる。反応管の外側に設けられる加熱部としては、一定の温度を反応管に供給できるものであればいかなるものを使用してもよいが、例えばヒートブロック、恒温槽、加熱空気等が好適に使用される。例えば恒温槽を使用する場合には、94℃、55℃、及び72℃に設定された3種の恒温槽を使用し、恒温槽内の温水またはオイル等に所定の長さの反応管を浸漬すればよい。PCR法は、上記の変性工程、アニーリング工程、及び伸長工程を基本サイクルとし、通常、このサイクルを25~35回繰り返すことにより行われる。図1に示す直線型の反応装置を使用する場合には、94℃、55℃、及び72℃の加熱部を繰り返し設けて必要なサイクル数の加熱処理を行えばよい。多数のサイクルを繰り返す場合には、反応管を例えば螺旋型に加工して、変性工程用加熱部、アニーリング工程用加熱部、及び伸長工程用加熱部を繰り返し通過させることにより、効率よく増幅を行うことができる。例えば加熱部として恒温槽を使用する場合には、たとえば図2に示されるような螺旋型に加工された反応管を、反応回数に対応する数だけ3種類の恒温槽に繰り返し浸漬すればよい。反応管の末端に例えばフラクションコレクターを設けることにより、PCRにより増幅されたDNAを含む反応液を効率よく回収することができる。また、反応管の途中に例えば紫外線検出器等の検出部を設けて増幅過程をモニターしてもよい。

【0010】本発明の別の態様によれば、本発明のDNA増幅方法を行うためのDNA増幅装置が提供される。本発明の装置は、内部でDNAポリメラーゼ、鋳型DNA、プライマーDNA、及びdNTPを含む反応液が移動させるための反応管1、該反応管の外側に設けられた加熱部2、該反応液を該反応管内で移動させるための動力部3を備えたDNA増幅装置であり、さらに好ましくは、該装置はバッファータンク6、反応液導入部4、及び反応液回収部5が設けられた装置である。反応管及び加熱部としては上記のものを使用することができ、動力部としては、例えばHPLCポンプ等を使用すればよい。反応液導入部としては、例えばHPLC用のインジェクター等を、反応液回収部にはフラクションコレクター等を使用すればよい。本発明の装置の1例を図2に示すが、本発明の装置はこの装置に限定されることはない。

【0011】

【発明の効果】本発明の方法によれば、極めて正確な加
Tth ポリメラーゼ:

熱時間でPCR法行うことができ、効率よくDNA増幅を行うことができる。本発明の方法では、加熱時間の遅れによる酵素の失活もなく、増幅効率が低下することがない。また、水分の蒸発やサンプルチューブの蓋の内側での水滴形成がないので、蒸発防止用のオイルを使用する必要もない。さらに、多数の試料を用いて同時に増幅反応を行なうことができるので有用である。

【実施例】以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されることはない。

【0012】図2に示される装置を使用して本発明の方法を実施した。反応管1としてテフロン反応管(内径0.5mm、外形1.5mm)を使用し、加熱部2として94℃、55℃、及び73℃に調節された温水を満たした恒温槽を用いた。サーモスタットとして各恒温槽にタイテックサーモミンスターを使用した。反応管1の末端は動力部3に接続されており、動力部から加熱部に至る反応管の途中には反応液導入部4が設けられている。フローバッファはバッファータンク6から供給されている。本実施例では、動力部3として日本分光製のHPLCポンプBIP-1、反応液導入部4としてレオダイン製HPLC用インジェクターを使用した。反応管1は、加熱部2において94℃の温水に150mm、55℃の温水に200mm、73℃の温水に300mmの長さで順次浸漬されており、さらに72℃の温水を出た反応管1は再度94℃、55℃、及び73℃の温水に同じ長さで順次浸漬されるように螺旋型に加工されている。94℃の恒温槽は2本鎖DNAを解離させるための槽であり、55℃の恒温槽は1本鎖に解離したDNAにプライマーDNAをアニーリングするための槽であり、73℃の槽はプライマーDNAが結合したDNAから第2鎖の複製を行わせる槽である。反応管及び反応管の内部の反応液も同一の温度に保持されている。反応管1は全体で22巻きの螺旋を形成しており、反応管1の内部を移動する反応液は、94℃→55℃→73℃の温度サイクルで22回繰り返し処理される。73℃の加熱部2を出た反応管1は反応液回収部5としてフラクションコレクターに接続されており、ここで反応液の回収が行われる。

【0013】上記の装置を使用して、フローバッファを反応管1の内部に注入した。フローバッファの流量及び加熱部の温度を安定させた後に、マイクロシリンジを用いて空気5μlを反応液導入部4から注入した。その後反応液5μl及び空気5μlを順次注入し、さらに再度フローバッファを連続的に注入して反応液を加熱部に移動させた。反応液及びバッファー組成は以下の表1に示す通りである。加熱処理後の反応液をフラクションコレクターで分画して、1%アガロースゲル電気泳動で生成物を確認した。

【表1】

フローバッファー : 67 mM Tris ・ 塩酸 (pH 8.8)/16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /
6.7 mM MgCl_2

反応バッファー : 67 mM Tris ・ 塩酸 (pH 8.8)/16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /
6.7 mM MgCl_2 /10 mM 2-ME/0.2 mM dNTPs

Taq ポリメラーゼ :

フローバッファー : 10 mM Tris ・ 塩酸 (pH 8.3)/50 mM KCl/
2 mM MgCl_2

反応バッファー : 10 mM Tris ・ 塩酸 (pH 8.3)/50 mM KCl/
2 mM MgCl_2 /0.2 mM dNTPs

プライマーDNA (ABI DNA合成機で合成後、OPC カートリッジで精製) :

UN-24 : 5'-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3'

UNR-24 : 5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'

鋳型DNA :

pNF-1 : 1.2 kb PCR プロダクト

pUCtDHFR : 0.7 kb PCR プロダクト

pBluescript KS+ : 0.23 kb PCR プロダクト

【0014】試験例1

鋳型DNAとして20 ng/ μl (10 nM) のpNF-1 を用い、2
種類のDNAポリメラーゼを用いて本発明の方法を実施
した。結果を表2に示す。表中、+の数は増幅の程度を

示し、+の数が多ければ、増幅の程度が高いことを示
す。

【表2】

No.	ポリメラーゼ	流速	線速度	処理時間	増幅度
		$\mu\text{l}/\text{min.}$	$\text{mm}/\text{min.}$	94℃-55℃-73℃	
例1	Tth	20	102	1'30"-2'-3'	+++
例2	Taq	20	102	1'30"-2'-3'	++
例3	Tth	40	204	45"-1'-1'30"	++
例4	Tth	60	306	30"-40"-1'	+

【0015】試験例2

鋳型DNAとしてpNF-1 を用い (0.5% Triton X-100 で
100℃、5分間処理したもの)、鋳型DNAの濃度を変
化させて本発明の方法を実施した。ポリメラーゼとして
Tthポリメラーゼを用い、流速 40 $\mu\text{l}/\text{min.}$ 、線速度 2

04 mm/min.、処理時間 (94℃-55℃-73℃) 45"-1'-
1'30" とした。比較例としてシータス社のサーマルサイ
クラーを用いて同様の実験を行った。結果を表3に示
す。

【表3】

No.	鋳型DNA濃度	増幅度
	$\text{ng}/\mu\text{l}$	
例5	1	+++
例6	0.1	+
比較例1	0.02	+
比較例2	0.2	+
比較例3	0.4	++
比較例4	1.0	+++
比較例5	2.0	+++

試験例3

鋳型DNAとして1 ng/ μl のpNF-1 (1.2 kbpフラグメン
ト)、pBluescript KS+ (0.23 kbp フラグメント)、
及び pUCtDHFR (0.7 kbp フラグメント) を用いて、連続
処理を行った。pNF-1 を含む反応液 5 μl 、pBluescrip
t KS+ を含む反応液 5 μl 、及び pUCtDHFR を含む反応
液 5 μl を10分間隔でインジェクトした。各反応液間
は空気で分離した。DNAポリメラーゼとして Tthポリ

メラーゼを用い、流速40 $\mu\text{l}/\text{min.}$ 、線速度 204 mm/mi
n.、処理時間 (94℃-55℃-73℃) 45"-1'-1'30" と
した。その結果、各PCRにおけるクロスコンタミネー
ションはほとんどなく、良好な増幅が可能であった。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法を実施するためのDNA増幅装置
の概念図である。

【図2】本発明の方法を実施するためのDNA増幅装置

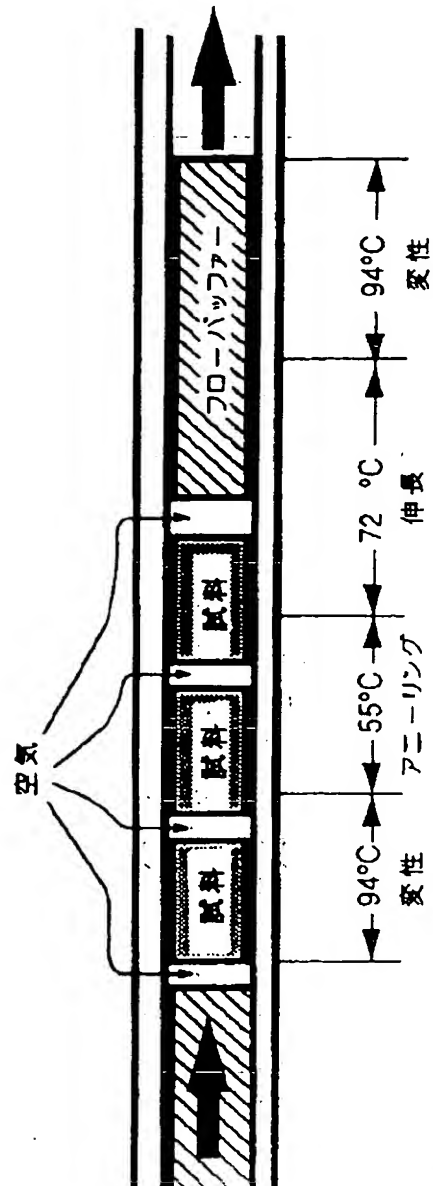
を示す図である。

【符号の説明】

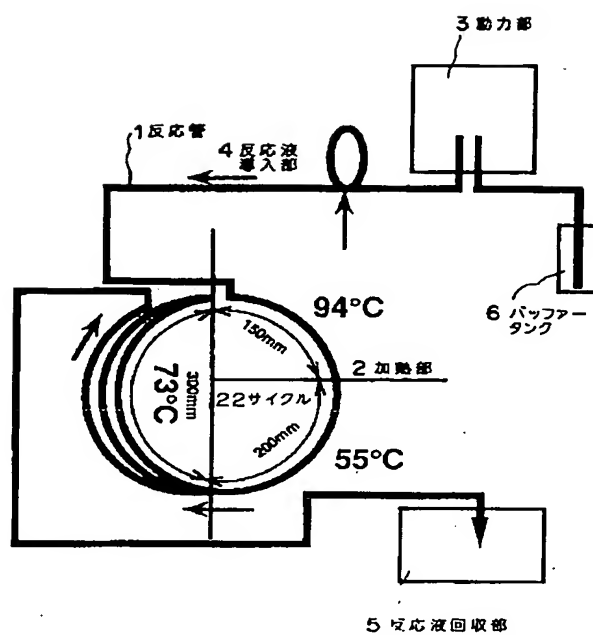
- 1 反応管
- 2 加熱部

- 3 動力部
- 4 反応液導入部
- 5 反応液回収部
- 6 バッファータンク

【図1】



【図 2】



フロントページの続き

(72) 発明者 養王田 正文
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所
内

(72) 発明者 遠藤 勲
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所
内